

Maria Luiza Coelho da Rocha

Avaliação da capacidade de bioacumulação e da
toxicidade do ácido abiético em microalgas
(*Scenedesmus subspicatus*) e em microcrustáceos
(*Daphnia magna*).

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Programa de graduação
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau em
licenciatura e bacharel do curso de
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique
Lemos Soares

Florianópolis
2015

Coelho da Rocha, Maria Luiza

Avaliação da capacidade de bioacumulação e da toxicidade do ácido abiético em microalgas (*Scenedesmus subspicatus*) e microcrustáceos (*Daphnia magna*) ; orientador Carlos Henrique Lemos Soares- Florianópolis, SC, 2015.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. resina ácida. 2. Toxicidade. 3. bioacumulação

I Soares, Carlos Henrique Lemos. II Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III Título.

Maria Luiza Coelho da Rocha

**Avaliação da capacidade de bioacumulação e da toxicidade do ácido
abiético em microalgas (*Scenedesmus subspicatus*) e em
microcrustáceos (*Daphnia magna*).**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas, e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 08 de dezembro de 2015.

Prof.^a Maria Risoleta Freire Marques,
Dr.^a Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof, Dr. Carlos Henrique Lemos Soares
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Yona Garcia Simom
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Leonardo Rubi Rorig
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais amados que sempre apoiaram minhas escolhas e me deram suporte para seguí-las.

Aos queridos professor Carlos Henrique Lemos Soares e Ivana Eunice Baptista pela paciência, confiança e ensinamentos.

À comunidade universitária (professores, alunos, servidores e comunidade) por me mostrarem um mundo diversificado, cheio de possibilidades e novas descobertas. Um mundo necessário ao meu amadurecimento pessoal.

À amizade das minhas flores belas da 09.02 que participaram dos melhores momentos da minha vida, sem dúvida alguma ! Tantos cafés, risadas, estudos na BU que guardarei com muito amor sempre !

Ao Grupo de Dança Abayomi da UFSC por despertar meu corpo novamente para a dança, por me mostrar uma cultura pela qual sou apaixonada e por fornecer momentos de verdadeiro prazer e encantamento.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

De tudo, ficaram três: a certeza de que ele estava começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.

(Fernando Sabino, 1956)

RESUMO

A contaminação de ambientes aquáticos por efluentes industriais é tóxica aos organismos e muitas substâncias podem bioacumular e comprometer animais de níveis tróficos diferentes. Esse estudo teve como objetivo avaliar o potencial de bioacumulação do ácido abiético encontrado nos efluentes da indústria do papel e celulose e seu respectivo potencial de toxicidade em microalgas (*Scenedesmus subspicatus*) e microcrustáceos (*Daphnia magna*). Foram feitos testes de toxicidade aguda com as microalgas e testes de toxicidade crônica com os microcrustáceos com o agente tóxico. Testes de cromatografia foram feitos para analisar a bioacumulação. O ácido abiético (ABT) se mostrou tóxico aos microrganismos com um percentual de inibição do crescimento algal em torno de 25% e um percentual de redução do número de neonatos das dáfrias variando de 33,9% a 55% a medida que as concentrações da resina foram aumentadas. O ABT também se mostrou bioacumulável nas algas, apesar de possivelmente se biotransformar em outra substância tóxica pois não foi detectado nas análises cromatográficas.

Palavras-chave: resina ácida, toxicidade, bioacumulação.

ABSTRACT

The contamination of aquatic environments by industrial effluents is toxic to organisms and a lot of substances can bioaccumulate and affect animals of different trophic levels. This study aimed to evaluate the bioaccumulation potential of the abietic acid found in paper mill effluents and their respective potential for toxicity in microalgae (*Scenedesmus subspicatus*) and microcrustaceans (*Daphnia magna*). Acute toxicity tests with microalgae and chronic toxicity tests with microcrustaceans have been done with the toxic agent. Chromatography tests have been done to analyse the bioaccumulation. The abietic acid (AA) has proved to be toxic to microorganisms with an algal growth inhibition of about 25% and with a reduction of the number of neonates daphnia which ranged from 33.9% to 55% as the resin concentrations have been increased. The abietic acid (AA) has also been shown bioaccumulative in algae, however it might have been changed into another toxic substance since it hasn't been detected in the chromatography analysis.

Keywords: acid resin, toxicity, bioaccumulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de ácidos carboxílicos produzidos por coníferas. .	32
Figura 2: Filhote de daphnia magna normal.	37
Figura 3: Bioensaio de algas <i>Scenedesmus subspicatus</i>	39
Figura 4: Bioensaios com <i>Daphnia magna</i>	41
Figura 5: Preparação das amostras para a cromatografia.	43
Figura 6: Taxa de crescimento algal (%) em função do aumento da concentração de ABT (ppm).....	45
Figura 7: Teste de reprodução de 21 dias- dáfias expostas a diferentes concentrações do ABT e alimentadas com alga normal.	46
Figura 8: Teste de reprodução de 21 dias- Dáfias não expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas em diferentes concentrações do ABT..	48
Figura 9: Teste de reprodução de 21 dias- Dáfias expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas nas mesmas concentrações de ácido abiético.	49
Figura 10: Filhotes de dáfias expostas a diferentes concentrações do ABT e alimentadas com algas crescidas em meio de cultivo normal.. .	50
Figura 11: Filhotes de <i>Daphnia magna</i> expostas a diferentes concentrações de ABT e alimentadas com algas crescidas em meio de cultivo normal.....	50
Figura 12: Filhotes de <i>Daphnia magna</i> não –expostos ao ABT mas alimentados com algas crescidas em diferentes concentrações de ABT.	51
Figura 13: Filhotes de <i>Daphnia magna</i> expostas a concentrações de 3.6 ppm de ABT e alimentadas com algas crescidas na mesma concentração..	52
Figura 14: Filhote de <i>Daphnia magna</i> controle.....	52
Figura 15: Concentração do ABT em diferentes intervalos de tempo. Onde ABT padrão= ABT no meio de cultivo sem a alga; ABT sobrenadante= concentração do ABT no meio de cultivo após centrifugação da alga e ABT alga= concentração do ABT na alga após extração com solvente.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ranking mundial de países produtores de celulose.....	29
Tabela 2: Ranking mundial de países produtores de papel.....	30
Tabela 3: Composição química média da madeira de coníferas e folhosas.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABT- Ácido abiético

Bracelpa- Associação Brasileira de Celulose e Papel

CE- Concentração efetiva

CE50- Concentração efetiva mediana ou que causa efeito em 50% dos organismos ou que reduz a taxa de crescimento em 50% em relação ao controle.

CL50- Concentração letal que mata 50% dos indivíduos testados.

DDTs- diclorodifeniltricloroetano

HCb- hexaclorobenzeno

HCHs- hexaclorociclohexanos

PAHs- hidrocarbonetos poli- aromáticos

PCBs- Bifenóis clorados

POPs- Poluentes Orgânicos Persistentes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS.....	28
1.1.1 Objetivo Geral	28
1.1.2 Objetivos Específicos	28
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 RESINAS ÁCIDAS.....	29
2.2 ORGANISMOS UTILIZADOS.....	34
2.2.1 <i>Scenedesmus subspicatus</i>	34
2.2.2 <i>Daphnia magna</i>	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Testes de toxicidade aguda em <i>Scenedesmus subspicatus</i>.....	39
3.2 Bioensaios com <i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820).....	40
3.2.1 Teste de sensibilidade com dicromato de potássio (K ₂ Cr ₂ O ₇)	40
3.2.3 Teste de toxicidade crônica com o agente tóxico	41
3.2.3.1 Fecundidade	42
3.3.1 Preparação das amostras.....	43
3. 4 Análise estatística dos resultados obtidos nos testes de toxicidade	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Efeitos sobre o crescimento algal- Testes de toxicidade aguda em <i>Scenedesmus subspicatus</i>:	45
4.2 Efeitos sobre a reprodução de dáfrias- Bioensaios com <i>Daphnia magna</i>.....	45
4.2.1 Teste de reprodução 21 dias- Dáfrias expostas ao ácido abiético e alimentadas com alga normal (sem a contaminação pelo ABT):	46
4.2.2 Teste de reprodução 21 dias- Dáfrias não expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas em diferentes concentrações do ácido abiético:	47
4.2.3 Teste de reprodução 21 dias- Dáfrias expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas nas mesmas concentrações do ácido abiético:	48
4.3 Efeitos sobre aspectos morfológicos das dáfrias	49

4.3.1 Dáfnias expostas a diferentes concentrações do ácido abiético e alimentadas com alga normal (cultivadas sem contaminação pelo ABT):.....	49
4.3.2 Dáfnias não expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas em diferentes concentrações do ABT:	50
4.3.3 Dáfnias expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas na mesma concentração do ABT:.....	51
4.4 Cromatografia	53
5. CONCLUSÃO	55
6. REFERÊNCIAS	57
7. ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

As atividades agrícolas e industriais contaminam os ambientes aquáticos com diferentes tipos de poluentes e, dentre as centenas de poluentes e seus diversos mecanismos de toxicidade, muitos deles interferem na sinalização hormonal dos vertebrados. Através da alimentação pela água ou pelo sedimento, essas substâncias são absorvidas e podem ser acumuladas nos mais variados tecidos, em especial no tecido adiposo dos crustáceos, se a substância for lipossolúvel. Alguns estudos como de Mattig *et al.*, (1997) relataram a acumulação de compostos organoclorados, como bifenóis clorados (PCBs), diclorodifeniltricloroetano (DDTs), hexaclorociclohexanos (HCHs), hexaclorobenzeno (HCB) e poluentes derivados da indústria do petróleo como hidrocarbonetos poli-aromáticos (PAHs), em carangueijos e camarões.

Esses compostos são denominados de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). São compostos solúveis em lipídeos e acumulam-se nos organismos por serem resistentes à degradação, ou porque sua metabolização é mais lenta do que o processo de aquisição. Uma outra forma desses poluentes serem prejudiciais ao meio ambiente em que estão presentes é o fato de seus metabólitos poderem apresentar toxicidade. Cada poluente tem processo de absorção e eliminação diferente que, no conjunto, resultam nas diversas formas de acumulação entre as espécies. Essas dissimilaridades evidenciam os diferentes níveis de contaminação dos seres vivos presentes num dado ambiente (Canizares & Zini, 2009).

Ensaio ecotoxicológicos com bioacumulação são utilizados em análises rotineiramente empregadas em testes de toxicidade crônica. Testes de toxicidade crônica são experimentos de longa duração, que visam ao estudo dos efeitos não letais nos organismos aquáticos, a partir da sua exposição prolongada a concentrações sub-letais.

Segundo Borgmann (2000), estudos realizados com metais tóxicos vem demonstrando resultados significantes de bioacumulação em diversos organismos. Estudando-se o processo de bioacumulação, pode-se prever os efeitos biológicos nas espécies envolvidas mas não necessariamente no ecossistema, tratando-se apenas da absorção de substâncias via superfícies do corpo (bioconcentração). Por outro lado, a biomagnificação é a transferência dessas substâncias ao longo da cadeia trófica (Ratte, 1999) o que pode nos dar um panorama maior da ação do agente tóxico.

De acordo com Aragão & Araújo (2006), os ensaios de toxicidade crônica mais difundidos mundialmente são os com *Daphnia* spp, com duração de 21 dias, e com *Ceriodaphnia* spp, de 7 dias de duração. As microalgas, que fazem parte do fitoplâncton, também estão dentre os organismos mais recomendados para avaliação de toxicidade aquática (aguda ou crônica), pois fornecem informações sobre possíveis alterações qualitativas e quantitativas das populações, tornando-se importantes em monitoramento ambiental. As microalgas da espécie *Scenedesmus Subspicatus* são comuns na água doce e por serem produtoras primárias na cadeia alimentar, exercem um papel ecológico fundamental na transferência de energia para níveis tróficos mais elevados (Djomo *et al.*, 1995).

Os cladóceros do gênero *Daphnia* são componentes chave na cadeia alimentar em ambientes aquáticos. Eles se alimentam do fitoplâncton e, portanto, são altamente envolvidos na transferência de massa e energia no ecossistema. Dessa forma, a qualidade do alimento para as dáfrias é de extrema importância já que qualquer deficiência nutricional ou agente tóxico presente pode alterar a qualidade do alimento e assim comprometer a performance desses animais forrageadores (Creuzberg & Elert, 2009). Os animais de topo de cadeia apresentam as concentrações mais altas de POPs. Portanto, os seres humanos são fortes candidatos à bioacumulação, tendo riscos de ocorrer problemas de saúde normalmente relacionados à presença destes compostos, como por exemplo, danos neurológicos, câncer, distúrbios reprodutivos e supressão da imunidade (Canizares & Zini, 2009).

As resinas ácidas estão naturalmente presentes na madeira, principalmente nas coníferas. O ácido deidroabiético e ácido abiético são os principais componentes e causadores dos efeitos tóxicos dessas resinas nos organismos. As resinas ácidas provenientes de *Pinus* e presentes nos efluentes das indústrias de papel e celulose demonstraram forte toxicidade em vários organismos e tem sido detectadas em águas superficiais e nos sedimentos distantes do ponto de descarga de efluentes (Peng & Roberts, 2000).

Essas resinas podem afetar a reprodução de alguns peixes, ao atrasar o tempo de eclosão dos ovos ou diminuir o número de eclosões, bem como podem alterar a produção do precursor da proteína do vitelo e também causar significativa perturbação endócrina nesses animais (Pandelides *et al.*, 2014). Mesmo ocorrendo o tratamento do efluente, a toxicidade crônica pode afetar a fecundidade das dáfrias (Xavier *et al.*, 2005). Estudos recentes realizados pelo Laboratório de Ecotoxicologia Ambiental têm demonstrado que ácido abiético é capaz de promover

desregulação hormonal em peixes da espécie *Danio rerio*, com a consequente redução do número de ovos produzidos, bem como alteração das concentrações de hormônios como estradiol e testosterona e alterações no desenvolvimento das larvas. Tais efeitos são acompanhados pela alteração da expressão gênica de enzimas envolvidas na biossíntese de hormônios esteróides (Soares *et al.*, 2015, submetido). Há poucos estudos com os organismos utilizados neste trabalho a respeito dos efeitos tóxicos provocados pelas resinas ácidas, mas sabe-se que podem aumentar a mortalidade e afetar o crescimento bem como a reprodução dos mesmos (Kamaya & Suzuki, 2005). Neste sentido, o estudo da bioacumulação e respectivo potencial tóxico do ácido abiético apresenta-se como muito interessante e elucidativo dos mecanismos de bioacumulação.

Visto que essas resinas ácidas podem ser bioacumuladas em organismos e que as análises físico- químicas da água muitas vezes não conseguem demonstrar o verdadeiro potencial tóxico desses poluentes no ambiente, se faz necessário um estudo mais sistemático e que possibilite o aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos de bioacumulação. A literatura é escassa em estudos de bioacumulação e biomagnificação com dáfias e microalgas, em relação a essas substâncias químicas. Esse estudo permitirá uma análise a longo prazo e um entendimento maior da propagação dos agentes tóxicos nas comunidades presentes em um determinado local. Levando-se em consideração que indústrias de papel e celulose descarregam no ambiente grandes quantidades de efluentes contendo esses componentes, inclusive no estado de Santa Catarina (Paiva, 2006), conforme demonstraram pesquisas anteriores realizadas no Laboratório de Ecotoxicologia Ambiental, tais estudos mostram-se bastante oportunos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de bioacumulação do ácido abiético nas microalgas e o seu respectivo potencial de toxicidade em dáfrias e microalgas.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Conhecer o crescimento da alga *Scenedesmus subspicatus* em meios contendo diferentes concentrações de ácido abiético ;
2. Avaliar a reprodução de *Daphnia magna* expostas e não expostas à resina e alimentadas com a alga exposta e não exposta à mesma, quanto ao número de neonatos produzidos em testes de 21 dias alterações morfológicas nos filhotes;
3. Determinar a concentração de ácido abiético no meio de cultivo e no extrato de algas usando cromatografia gasosa, acoplada a espectroscopia de massa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESINAS ÁCIDAS

Segundo dados da Associação Brasileira de Celulose e Papel (Bracelpa), o Brasil é o quarto maior produtor de celulose do mundo (tabela 1) e o nono produtor de papel mundial (tabela 2). A matéria-prima provém 100% de áreas de reflorestamento, principalmente de eucalipto (85%) e pinus (15%). A produção de papel está muito concentrada nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, que resultam em 83% do volume de papel fabricado no país (De Paiva, 2004).

Tabela 1: Ranking mundial de países produtores de celulose.

Fonte: Bracelpa, 2013	Celulose	
	País	Mil tonelada
	1- EUA	50.351
	2- China	18.198
	3- Canadá	17.073
	4- Brasil	13.977
	5- Suécia	11.672
	6- Finlândia	10.237
	7- Japão	8.642
	8- Rússia	7.519
	9- Indonésia	6.710
	10- Chile	5.155
	11- Índia	4.095
	12- Alemanha	2.636
	Demais	10.376
	Total Mundo	166.641

Fonte: Bracelpa, 2013

Tabela 2: Ranking mundial de países produtores de papel

Fonte: Bracelpa, 2013

Papel	
País	Mil tonelada
1- China	102.500
2- EUA	74.375
3- Japão	26.083
4- Alemanha	22.630
5- Suécia	11.417
6- Coreia do Sul	11.333
7- Canadá	10.751
8- Finlândia	10.964
9- Brasil	10.260
10- Indonésia	10.247
11- Índia	10.242
12- Itália	8.664
Demais	90.789
Total Mundo	399.985

Fonte: Bracelpa , 2013

O gênero *Pinus* fornece a maior parte da madeira para a indústria de papel e celulose na região sul do Brasil (Vasques *et al.*, 2007). São denominadas coníferas (pinho, araucárias, abeto, entre outros) possuem a madeira macia fibras longas. A qualidade e produtividade de papéis produzidos a partir de *Pinus* e eucaliptos é melhor que a produção oriunda de florestas nativas (Cherubin, 1999).

A composição química da madeira compreende dois grandes grupos: componentes de alta massa molecular- celulose, hemicelulose e lignina e componentes de baixa massa molecular- extrativos e as cinzas (Panshin & Zeeuw, 1970). A tabela 3 mostra a composição química média da madeira de coníferas (pinus) e folhosas (eucaliptos).

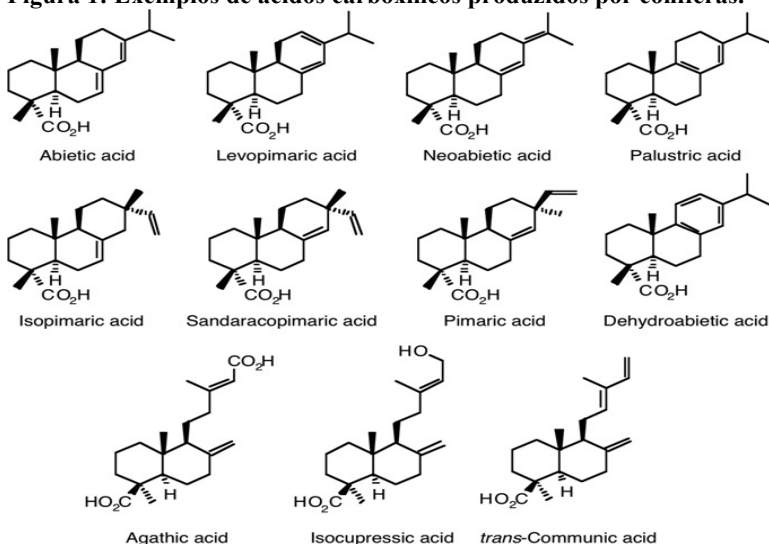
Tableau 3: Composição química média da madeira em coníferas e folhosas.

Constituinte	Coníferas (%)	Folhosas (%)
Celulose	42 ±2	45±2
Hemicelulose	27±2	30±5
Lignina	28±2	20±4
Extrativos	5±3	3±2

Fonte: Fengel & Wegener, 1989

Os extrativos da madeira constituem um grande número de componentes, ganhando destaque as resinas ácidas e os polifenóis. Esses componentes podem ser extraídos da madeira por meio de solventes orgânicos tais como etanol, acetona, diclorometano, éter etílico e tetracloreto de carbono (Barreiros, 2006). Essa classe de extrativos pode ocupar de 0,2 à 0,8% do peso total da madeira (Fengel & Wegener, 1989). As resinas ácidas formam vários grupos de ácidos carboxílicos derivados de diterpênicos tricíclicos, sendo as mais encontradas o ácido primário, o ácido desidroabiético, o ácido palústrico e o ácido abiético (Liss *et al.*, 1997). Os diterpênicos das resinas ácidas tem uma cadeia bastante diversificada graças aos isômeros de ligação dupla, diastereoisômeros e grupos funcionais adicionais (Keeling *et al.*, 2006) (figura 1). Nesse estudo, o ácido abiético foi escolhido pelo fato de ter sido a resina mais abundantemente encontrada nos efluentes tratados das indústrias Klabin de Otacílio Costa e Correia Pinto, estudados no Laboratório de Ecotoxicologia Ambiental.

Figura 1: Exemplos de ácidos carboxílicos produzidos por coníferas.



Fonte: Keeling *et al.*, 2006.

A fabricação do papel envolve cinco passos básicos (Sreekrishnan, 2001), e o processo varia de acordo com a indústria e o tipo de técnica adotada. É no processo da polpação (segundo passo) e no processo de branqueamento (terceiro passo) que as resinas ácidas são extraídas. A polpação é o processo pelo qual a maioria da lignina e hemicelulose é removida para resultar em uma polpa rica em celulose, no qual há a transferência de ácidos graxos de cadeia longa e resinas para a água (licor de polpação). O branqueamento retira a cor amarelada da polpa de celulose, onde diversos agentes como o cloro, dióxido de cloro, peróxido de hidrogênio, ozônio, oxigênio, etc são utilizados. Tanto podem ser utilizados sozinhos ou de forma conjunta para ser mais eficiente. O cloro empregado no branqueamento reage com as ligninas e proporciona a formação de compostos clorados de alta toxicidade (Neto, 2002).

Os efluentes não tratados contêm uma grande quantidade dessas resinas que varia com o processo de polpação da madeira e com o uso da água. Geralmente, os processos químicos de polpação geram efluentes com menor concentração de resinas ácidas do que os processos mecânicos de polpação. E mesmo assim, alguns estudos já relataram níveis altos de toxicidade para organismos aquáticos em efluentes oriundos de processos químicos de polpação (Liss *et al.*, 1997). É

possível detectar as resinas ácidas tanto em águas superficiais que recebem esses efluentes, quanto em sedimentos que se encontram perto ou há uma certa distância do ponto de descarga (McMartin *et al.*, 2002).

As resinas ácidas são hidrofóbicas e são parcialmente removidas quando estão adsorvidas às fibras durante a decantação. Dentre os tratamentos de efluentes, o lodo ativado se mostra mais eficiente na remoção das resinas do que as lagoas de aeração devido ao seu número maior de sólidos. Além disso, os microrganismos na lagoa aerada são incapazes de responder rapidamente ao derramamento de resinas ácidas e ácidos graxos (Makris & Banerjee, 2002). Porém, os tratamentos de efluentes com lodo ativado e lagoa de aeração utilizados nas indústrias catarinenses para torná-los menos tóxicos, não se mostraram efetivos na remoção de resinas ácidas, tendo sido encontradas concentrações na faixa de concentração de 2 a 15 ppm.

O biotratamento com bactérias geralmente demonstra ser uma alternativa eficiente para reduzir os parâmetros de poluição dos efluentes. Apesar das resinas ácidas serem consideradas facilmente biodegradáveis, elas podem ser biotransformadas por bactérias e fungos em produtos bioacumuláveis e mais resistentes à biodegradação do que seus compostos de origem como o reteno, por exemplo (Liss *et al.*, 1999; Makris & Banerjee, 2001; Mohn & Stewart, 1997; Bicho *et al.*, 1995). Portanto, a remoção das resinas ácidas ainda é incompleta e, pouco se sabe sobre os fatores que influenciam a biodegradação das mesmas.

Grande parte da toxicidade dos efluentes gerados nas indústrias do papel e celulose vem das resinas ácidas. Alguns estudos demonstraram que são tóxicas para peixes e microrganismos (Oikari *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 1995; Milestone *et al.*, 2012). As principais concentrações letais da maioria das resinas ácidas em testes de 96-h estão entre 0.5 e 1.5 ppm para peixes como a truta. Além disso, 20 de 70% de toda toxicidade dos efluentes tem sido relacionada às resinas ácidas (Wang *et al.*, 1994). Estudos como o de Kovacs & Voss, 1992, constataram que a concentração de resinas ácidas nos efluentes de papel e celulose estão relacionados com a toxicidade letal aguda. O poder de toxicidade das resinas ácidas se mostrou inversamente proporcional a suas respectivas solubilidades. Testes com *Daphnia magna* e algumas resinas ácidas, mostraram uma CL50 variando de 0,02 à 1,01 ppm em testes de 96 horas de exposição. Sendo o ácido pimárico mais tóxico que o abiético. As resinas ácidas comprovaram ter atividade anti-estrogênica em um estudo realizado com sete tipos de resinas ácidas em testes de cromatografia/ espectometria de massa (Terasaki *et al.*,

2009). Porém, ainda precisa-se de mais estudos para explicar o potencial de toxicidade desses compostos (Peng & Roberts, 2000).

2.2 ORGANISMOS UTILIZADOS

2.2.1 *Scenedesmus subspicatus*

No presente estudo foi utilizada a microalga verde *Scenedesmus subspicatus*, espécie encontrada em rios e lagos do mundo inteiro. É uma espécie colonial pertencente ao grupo das clorofíceas (Renault *et al.*, 2008). A reprodução assexuada das colônias se dá por sucessivas divisões do protoplasma dentro da parede celular (Trainor, 1996).

As algas são bons indicadores biológicos e, por isso são muito utilizadas em testes de toxicidade. São extremamente sensíveis às alterações ambientais e tem o ciclo de vida consideravelmente curto, possibilitando a observação de efeitos tóxicos em várias gerações. Mudanças físico- químicas no ambiente aquático trazem não só consequências para a dinâmica de comunidades de algas, mas também para todo o ecossistema, já que são a base da cadeia trófica (Costa *et al.*, 2008).

Os efeitos tóxicos dos poluentes industriais podem se expressar através da baixa produção de biomassa, baixa diversidade e alterações na fotossíntese das algas. Alguns estudos vem sendo feitos para demonstrar o efeito tóxico de certos componentes. Segundo, Burkiewicz *et al.*, 2004, elevadas concentrações de alguns inseticidas podem inibir o crescimento de *Scenedesmus subspicatus*. Concentrações sub-letais de cobre afetam o crescimento e a fotossíntese de algas do gênero *Scenedesmus* (Perales-Vela *et al.*, 2006). As propriedades físico-químicas (coeficiente de solubilidade em água, coeficiente de volatilização, luz, temperatura) de polihidrocarbonetos demonstraram forte relação no potencial de toxicidade em *Scenedesmus subspicatus*. Quanto maior o coeficiente de solubilidade de um polihidrocarboneto, menor é sua CE50 (Djomo *et al.*, 2009).

2.2.2 *Daphnia magna*

Daphnia magna é um microcrustáceo muito utilizado como indicador biológico em estudos de controle da qualidade de água, e em ensaios biológicos para a determinação de toxicidade de efluentes (Flohr *et al.*, 2005 ; Baptista *et al.*, 2000), metais (Biesinger & Christensen, 1972), PFAs (Dai *et al.*, 2012), herbicidas (Lessard & Frost, 2012), resinas ácidas (Kamaya *et al.*, 2005).

Kamaya *et al.*, 2005 encontraram que a concentração de 4 ppm de ácido abiético não afetou os parâmetros fisiológicos nem reprodutivos das dáfrias, enquanto que uma mortalidade significativa foi encontrada em 8 ppm. Em exposição a 1 ppm, as dáfrias tiveram um crescimento reduzido. Esse estudo evidenciou que o ácido abiético enfraquece discretamente o crescimento das dáfrias.

A qualidade do alimento fornecido às dáfrias pode influenciar o crescimento e a produção de ovos. O crescimento de *D. magna* quando alimentada com algas pobres em esteróis é reduzido (Martin-Creuzburg & Elert, 2009).

Popularmente conhecida como pulga d'água (*water fleas*), *Daphnia magna*, é uma espécie de microcrustáceo dulcícola planctônica. Pertence à classe *Crustacea* e à ordem *Cladocera*. Mesmo sendo natural de regiões temperadas, é um organismo padrão utilizado em todo o mundo em testes de toxicidade, cujos protocolos são descritos pela EPA e OECD. São consumidores primários ou secundários que compõem o zooplâncton e exercem um papel fundamental no ecossistema, pois permitem o elo entre os níveis inferiores e superiores da cadeia alimentar (CETESB, 1988 ; Zagatto, 1999).

As dáfrias se alimentam de partículas que flutuam na água (fitoplâncton, matéria orgânica vegetal em decomposição), porém os alimentos que mais consomem são as algas de vida livre, as bactérias e os fungos. A morfologia das dáfrias é bem simples. Elas possuem uma carapaça transparente que envolve praticamente todo o corpo a qual permite a visualização dos órgãos internos. A cor varia de acordo com o alimento ingerido, podendo ter tons amarelados, avermelhados e esverdeados. A cabeça é estreita e alongada, com um par de olhos compostos e duas antenas ramificadas, e membros em forma de folhas inseridos na carapaça que produzem uma corrente de água, carregando alimento e oxigênio para a boca e brânquias. As fêmeas possuem entre 3 mm a 5 mm de comprimento (figura 2).

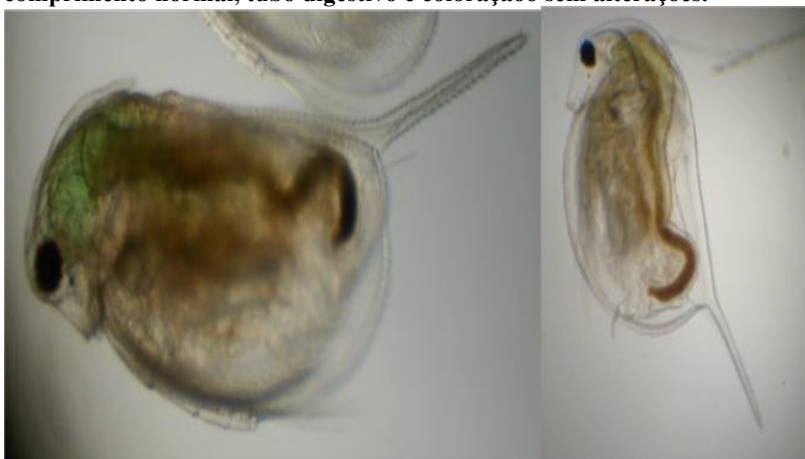
No verão, é muito comum observar um crescimento intenso « blooming » de dafnídeos. Essa grande proliferação é devido à capacidade de replicar-se por partenogênese em condições adequadas de alimentação, temperatura, luminosidade, etc.

A partenogênese gera descendentes idênticos geneticamente, pois é um tipo de reprodução assexuada (célula diplóide- filhos são clones dos pais). Sendo assim, qualquer diferença no estado físico dos clones se deve a condições do meio ambiente. Em meio natural, ao final da primavera, durante o verão, início do outono, as dáfnias produzem em média 10 jovens por indivíduo. Através do auxílio do microscópio pode-se ver os embriões desenvolvidos no corpo da mãe. As fêmeas fazem a partenogênese com apenas cinco a nove dias de vida, geralmente a cada três ou quatro dias, cerca de vinte e cinco vezes durante seu período de existência (Korpelainen, 1990).

A poluição, a falta de alimento e condições abióticas inadequadas resultam no desenvolvimento de machos e as fêmeas produzem ovos haplóides que podem ser fertilizados (reprodução sexuada) (Hebert, 1978). Estes ovos fertilizados desenvolvem pequenos embriões recobertos por uma carapaça escura (preto amarronzada) e quitinosa, em forma de sela, chamado efípio. Os efípios são mais resistentes às condições desfavoráveis do meio, dessa forma, devem ser descartados das culturas no laboratório para não afetar os testes de toxicidade e sensibilidade.

Os machos são menores que as fêmeas (cerca de 2mm), tem antenas maiores, pós- abdômen modificados e as primeiras pernas, são em forma de gancho.

Figura 2: Filhote de daphnia magna normal- espinho apical reto e com comprimento normal, tubo digestivo e coloração sem alterações.



Fonte: elaborado pela autora.

2.3 Bioacumulação e biomagnificação

A retenção dos contaminantes tóxicos nos organismos envolve processos de acumulação diferentes: a bioconcentração, a bioacumulação e a biomagnificação. A bioconcentração se difere da bioacumulação pelo fato do organismo se contaminar através de uma exposição ao contaminante, que não seja através da alimentação. Logo, é a concentração retida resultante no organismos a partir das superfícies respiratórias e dérmicas após os processos de assimilação e eliminação. A bioacumulação abrange todas as rotas de exposição ao contaminante, incluindo a exposição através da dieta alimentar. Já a biomagnificação é quando existe um processo de transferência do poluente ao longo da cadeia trófica, onde pode-se ver um aumento da concentração de contaminantes nos tecidos à medida que os níveis tróficos avançam (Costa *et al.*, 2008).

Organismos aquáticos como algas, anelídeos, artrópodes, moluscos e peixes assimilam os agentes químicos através da água por três vias principais: difusão, transporte especial e adsorção. Porém, a maioria dos xenobióticos entra nos organismos aquáticos pela difusão, por membranas semipermeáveis como as de brânquias e trato digestivo (De Paiva, 2004).

A presença dos contaminantes nos organismos podem ser sentidas nas populações por algum distúrbio na reprodução ou na migração,

alterando a taxa de nascimento e mortalidade, por exemplo. Dessa forma, atinge a estrutura e função das comunidades ao alterar a diversidade de espécies e modificar a relação predador- presa. Além disso, a função do ecossistema também pode ser comprometida pois alterações nos processos de respiração, fotossíntese e no fluxo de nutrientes podem acontecer (Connell & Miller, 1984).

Alguns estudos já foram feitos com a bioacumulação de metais em organismos aquáticos e demonstraram uma redução de 75% da capacidade reprodutiva de copépodos (um outro tipo de microcrustáceo) expostas a dietas contaminadas com metais (Ag, Cd, Hg, Se, Zn) devido ao número menor de ovos produzidos e ao insucesso de muitas eclosões (Fisher & Hook, 2002). Há outros estudos como o de Walsh *et al.*, (1994), o qual sugere que as conchas de gastrópodes podem ser utilizadas como indicadores de contaminação de águas por efluentes da indústria de papel e celulose, pois elas bioacumulam hidrocarbonetos alifáticos e são de fácil manuseio.

Os prejuízos no desenvolvimento no embrião das dáfrias dentro da câmara de incubação de fêmeas são um dos principais efeitos da exposição ao alimento (Orchard *et al.*, 2002), devido ao falho processo de vitelogênese, ausência de desenvolvimento dos ovos e redução do conteúdo de proteína (Hook & Fisher, 2002), ou ainda pela diminuição do tamanho do corpo dos organismos (Hulsmann, 2001). Outros estudos mostraram que o metal Cd pode prejudicar a digestão dos dafnídeos pelo fato de células passarem pelo intestino sem serem digeridas ou assimiladas (Taylor *et al.*, 1998). Além disso, Wang & Ke (2002) propuseram que o Cd pode ser biomagnificado ao longo da cadeia trófica de bivalves para gastrópodes predadores.

Visto o poder de bioacumulação e toxicidade dos metais e outros compostos, bem como a escassa literatura a respeito das resinas ácidas, acha-se pertinente este estudo já que estão presentes nos efluentes das indústrias catarinenses de papel e celulose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Testes de toxicidade aguda em *Scenedesmus subspicatus*

Foram feitos bioensaios com meios de cultivo contendo concentrações diferentes de ácido abiético (1,26; 2,34; 4,5 e 6,3 ppm). Essas concentrações foram escolhidas com base no fato de que as concentrações normalmente encontradas em efluentes variam de 5 a 150 ppm, e em especial, nos efluentes estudados das indústrias catarinenses podem ser detectadas concentrações em torno de 20 ppm. Para o crescimento das algas controles, foi utilizado somente o meio de cultivo (meio CHU) (Anexo 1 A). Os testes foram feitos em duplicata e seguindo a Norma DIN 38.412, parte 33, de março de 1991, com as devidas adaptações para as condições locais já testadas no Laboratório de Ecotoxicologia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (Figura 3).

A base de avaliação para este teste é a comparação da taxa de crescimento algal em soluções-teste nas condições de ensaio, com aquelas do controle, que não contém a substância em estudo. O teste foi iniciado com um inóculo de alga, a temperatura de 25 °C, luminosidade de 2500 lux e aeração constante. Os ensaios tiveram duração de 72 horas, sendo que a cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 1 mL, com pipeta automática, agitando para que a amostra fosse a mais homogênea possível e assim medir a transmitância no espectrofotômetro. A partir dos valores de transmitância, foram calculadas as taxas de crescimento algal. As taxas de crescimento algal foram determinadas a partir das transmitâncias correspondentes ao intervalo de 48h em relação ao de 0h. Foram feitas as diferenças entre esses intervalos e, em seguida as médias.

Figura 3: Bioensaio de algas *Scenedesmus subspicatus*.



Fonte: elaborado pela autora.

3.2 Bioensaios com *Daphnia magna* (Straus, 1820)

3.2.1 Teste de sensibilidade com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇)

O teste de sensibilidade com *Daphnia magna* foi realizado, antes de cada bioensaio, de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) presentes na NBR 12713 (2004e), visando assegurar a qualificação dos mesmos dentro dos padrões internacionais e garantir a validação dos testes realizados.

A sensibilidade das dáfias foi testada utilizando uma solução padrão de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) com concentração de 10 mg/L. Foram preparadas soluções teste nas concentrações: 0,55; 0,70; 0,85; 1,00; 1,15; 1,30; 1,45; 1,60; 1,75 ppm. Em cada bioensaio 10 dáfias (neonatos entre 2 h a 24 h), foram expostas em béqueres de 25 mL (com duas repetições para cada diluição), totalizando 20 indivíduos. No controle a exposição de dáfias foi somente em água de diluição. Após 24 horas de exposição em incubadora com foto-período e temperatura controlados, foram observados o número de organismos que não apresentaram mobilidade. Calculando em seguida a CE50 (concentração efetiva mediana) que se baseou nas condições em que não ocorreu mortalidade das dáfias, quando estas foram expostas ao dicromato de potássio em determinado tempo e concentração. O cálculo da CE50 foi realizado através do método *Trimmed SpearmanKarber* (Hamilton & Thurton, 1977).

A faixa aceitável de CE50, para o dicromato de potássio, deve estar entre 0,6 a 1,7 ppm. O valor médio obtido de CE50 para os testes de sensibilidade (24 horas) foi de 1,05 ppm, portanto, os resultados das CE50 dos testes de sensibilidade apresentaram-se dentro da faixa aceitável para o dicromato de potássio. De acordo com a ISO 6341 as dáfias cultivadas no laboratório de Ecotoxicologia Ambiental (CCB/UFSC) estavam aptas para serem utilizadas nos testes de toxicidade (aguda e crônica) com o ácido abiético.

3.2.2 Teste de toxicidade aguda (48h)

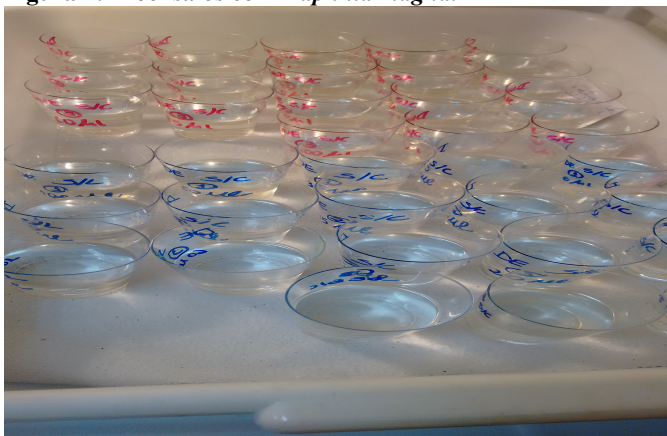
O teste de toxicidade aguda foi realizado de acordo com o protocolo OECD 202 (2004). O método de ensaio consistiu na exposição de indivíduos jovens (2 a 24 horas de idade) do organismo-teste (*Daphnia magna*) por um período de 24h a 48h a diferentes concentrações do ácido abiético (ABT). O efeito tóxico foi observado a

partir da verificação do efeito danoso à capacidade natatória dos organismos e/ou letalidade.

3.2.3 Teste de toxicidade crônica com o agente tóxico

As gerações de microcrustáceos, *Daphnia magna* (Crustacea, Phylopoda), foram cultivadas no Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica (CCB/UFSC). Foram feitos diferentes tipos de bioensaios com o agente tóxico. 1) Dáfnias expostas a diferentes concentrações do ABT e alimentadas com algas sem contaminação; 2) Dáfnias não expostas ao ABT e alimentadas com algas cultivadas em diferentes concentrações do ABT e 3) Dáfnias expostas a diferentes concentrações do ABT e alimentadas com algas cultivadas nessas mesmas concentrações do ABT. As concentrações testadas variaram de 1,08 ppm a 18 ppm. Foram feitos controles e em triplicatas (Figura 4).

Figura 4: Bioensaios com *Daphnia magna*.



Fonte: elaborado pela autora.

Nos bioensaios onde as dáfnias foram alimentadas com algas contaminadas, foram centrifugadas e congeladas parte das algas que serviriam de alimento e a outra parte não foi centrifugada e foi mantida na geladeira. As dáfnias eram contadas diariamente e com intervalos de dois dias era feita a troca do meio. A troca do meio se fez necessária porque vimos resultados que não seguiam um padrão em outros experimentos realizados. À medida que se passavam os dias, o ácido

abiético poderia estar se degradando. Da mesma forma, o ácido abiético era refeito com intervalo de no máximo uma semana com 90 mg de ácido abiético e 5 mL de etanol.

Para os testes de toxicidade crônica- teste de reprodução de 21 dias- foram utilizados neonatos (<16h de vida) obtidos a partir da quarta postura de uma única *Daphnia magna* (1 neonato/ béquer 50 ml), de acordo com OECD guideline 211 (OECD, 1998) e ABNT (2003b). As dáfrias cresceram em meio ISO, descrito na norma ISO 6341 (ISO, 1996) e foram alimentadas com as algas expostas e não expostas ao ácido abiético com uma quantia de aproximadamente 10^7 células mL⁻¹, *ad libitum*, por organismo adulto, diariamente, ou com intervalo de no máximo dois dias consecutivos. Os espécimes de *Daphnia magna* foram cultivados em ambientes com luminosidade em torno de 1000 lux, fotoperíodo de 12 h regulados com timer, temperatura da câmara termostática ficou na faixa de 18 a 22 °C. O meio de cultivo encontra-se no anexo 1B.

Foram observadas a fecundidade e as alterações morfológicas nos filhotes das dáfrias.

3.2.3.1 Fecundidade

A fecundidade foi avaliada pela contagem dos neonatos gerados no período de 21 dias. Utilizou-se como parâmetro a média dos filhotes gerados por fêmea, considerando-se o número de posturas ao longo dos 21 dias de duração dos testes.

3.2.3.2 Alterações morfológicas

A ocorrência de alterações morfológicas nos organismos foi um parâmetro de caráter qualitativo, sendo este avaliado ao final dos 21 dias dos testes, através de visualizações ao microscópio óptico.

3.3 Teste de bioacumulação e biomagnificação

A avaliação da taxa de bioacumulação foi realizada através da determinação da concentração do agente tóxico no meio de cultivo, no sobrenadante e nas algas nas concentrações de 3,6; 10,8 e 18 ppm em intervalos de 3h, 24h e 48h. A avaliação foi realizada utilizando-se cromatografia gasosa, empregando-se os seguintes procedimentos:

3.3.1 Preparação das amostras

Amostras de meio de cultivo; sem alga e com ácido abiético, com alga e sem ácido abiético e com alga e com ácido abiético, incubados conforme descrito na seção 3.1 e 3.2.3, foram coletadas em intervalos de tempo de 0, 3, 24 e 48h, e então preparadas para as análises. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, e o centrifugado (alga) foi separado do sobrenadante. Um volume de 5 mL do sobrenadante foi misturado a 5 mL de metil-tert-butileter (MTBE) em tubo de ensaio e agitado manualmente por 5 minutos, para extração do ácido abiético. Após a separação das duas fases, a fase orgânica foi coletada. As algas centrifugadas foram ressuspensas em meio de cultivo e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as algas foram ressuspensas em metanol/água (1:1) a 4 °C, submetidas ao ultrassom por 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas novamente a 3000 rpm por 10 minutos, sendo os resíduos das algas centrifugados separados da solução metanólica. A solução obtida – 5 mL - foi misturada com 5 mL de MTBE para extração, sob agitação por 5 minutos. 200 uL do extrato de MTBE obtido foi colocado em frasco de vidro e submetido ao vácuo para evaporação do solvente. O resíduo obtido após evaporação foi tratado com BSFA e colocado em estufa por 1h a 70 °C. A solução resultante foi redissolvida em 500 uL de acetonitrila e então submetida à análise cromatográfica. A figura 5 mostra as etapas pelas quais o material precisa passar antes de ser lido no cromatógrafo.

Figura 5: Preparação das amostras para a cromatografia.



Fonte: elaborado pela autor

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa usando um cromatógrafo marca DANI equipado com um espectrômetro de massa. As condições de análise foram: gás de arraste hélio, fluxo de 0,8 mL por minuto, injetor a 300 °C e detector a 250 °C. A programação de temperatura na coluna foi 50 °C por 1 minuto, 50 °C a 300 °C, com taxa de 20 °C/minuto.

3. 4 Análise estatística dos resultados obtidos nos testes de toxicidade

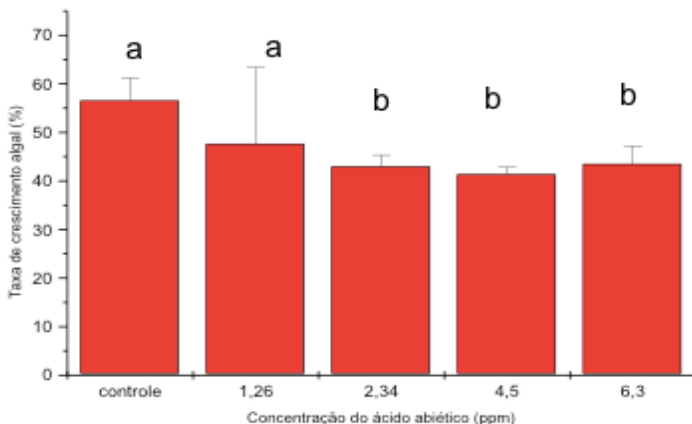
As análises estatísticas dos resultados obtidos para os testes de toxicidade foram feitas no software Origin calculando a média da taxa de crescimento algal, média do número de neonatos, seus respectivos desvios- padrão e também foi feito o test t para comparação das médias obtidas em relação ao controle e entre as mesmas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos sobre o crescimento algal- Testes de toxicidade aguda em *Scenedesmus subspicatus*:

De acordo com os resultados (figura 6), o teste de toxicidade aguda demonstrou que a alga é afetada pelo aumento das concentrações de ácido abiético. As algas crescidas nas concentrações de 2,34; 4,5 e 6,3 ppm tiveram seu crescimento reduzidos e estatisticamente diferentes ($p \leq 0.05$) do controle e iguais entre si ($p > 0.05$). Dessa forma, há um intervalo de concentração em que a mudança no meio causado pelo ácido abiético não altera significativamente o crescimento das algas, e cujo mecanismo de adaptação não está claro, pelos dados obtidos até o momento. A menor concentração de ácido abiético (1,26 ppm) teve um crescimento semelhante ao controle ($p > 0.05$) e diferente das demais amostras ($p \leq 0.05$), mostrando que uma concentração maior a 1,26 ppm de ácido abiético é tóxica para essas algas.

Figura 6: Taxa de crescimento algal (%) em função do aumento da concentração de ABT (ppm). As letras indicadas no gráfico significam que os valores semelhantes ou diferentes do controle (a, b, c), $p \leq 0.05$.

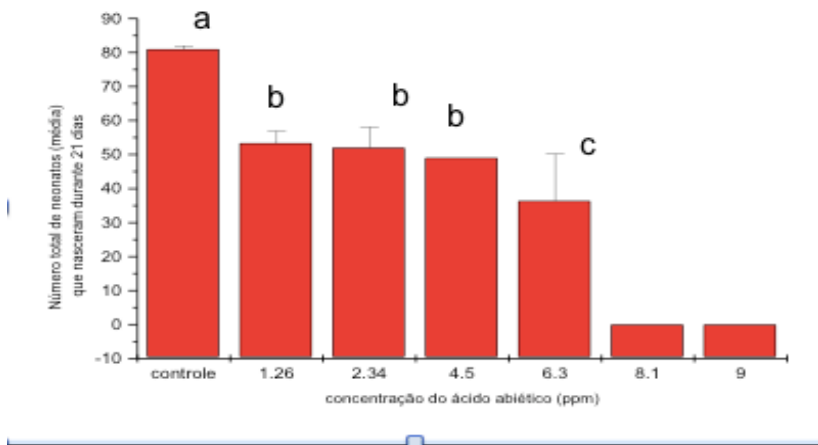


4.2 Efeitos sobre a reprodução de dáfias- Bioensaios com *Daphnia magna*.

4.2.1 Teste de reprodução 21 dias- Dáfnias expostas ao ácido abiético e alimentadas com alga normal (sem a contaminação pelo ABT):

Os resultados dos testes de toxicidade aguda de 48h (Anexo 2) mostraram uma CE50 de 9,88 ppm. Quando o teste de toxicidade crônica foi realizado observou-se que o número médio de neonatos das dáfnias expostas a diferentes concentrações do ácido abiético reduziu conforme as concentrações de ácido abiético foram aumentadas (Figura 7). As concentrações de 1,26; 2,34; 4,5 ppm tiveram um menor número de neonatos, estatisticamente diferentes do controle ($p \leq 0.05$) e semelhantes entre si ($p < 0.05$). O bioensaio com a maior concentração de ácido abiético (6,3 ppm) mostrou um valor muito mais reduzido do que o número médio de neonatos do controle e das demais amostras e estatisticamente diferentes também ($p \leq 0.05$). Nas concentrações de 8.1 e 9 ppm, as dáfnias morreram antes de completarem 21 dias.

Figura 7: Teste de reprodução de 21 dias- dáfnias expostas a diferentes concentrações do ABT e alimentadas com alga normal. O gráfico mostra o número médio de neonatos em bioensaios contendo diferentes concentrações do ABT (ppm). As letras indicadas no gráfico significam que os valores são semelhantes ou diferentes do controle (a, b, c) $p \leq 0.05$.



O fato do ácido abiético reduzir o número médio de neonatos a partir do aumento de suas concentrações, evidencia claramente seu potencial tóxico aos microcrustáceos estudados, embora a relação dose/resposta não demonstre uma relação diretamente proporcional.

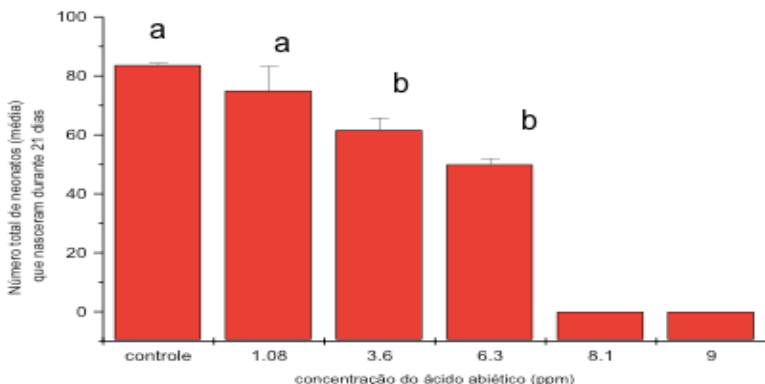
Sendo assim, torna-se coerente testar os efeitos acumulativos da resina nas algas. Com essa finalidade, foram realizados bioensaios com dáfrias em meio sem contaminação, mas sendo alimentadas com algas expostas/contaminadas com o ácido abiético.

Adicionalmente, é importante destacar que a redução do número de neonatos é um dos efeitos observados quando a dáfria está exposta a uma condição estressante. Neste caso, a condição estressante é promovida pela presença do agente tóxico, o qual pode promover alterações metabólicas importantes no organismo em teste. Esse tipo de efeito foi observado em um estudo feito com metais de Biesinger & Christensen, 1972.

4.2.2 Teste de reprodução 21 dias- Dáfrias não expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas em diferentes concentrações do ácido abiético:

O número médio de neonatos reduziu conforme as concentrações do ABT nas algas servidas como alimento eram aumentadas (figura 8). Isso demonstra que apesar das dáfrias não estarem em um meio contaminado, elas tiveram sua reprodução prejudicada pelo aparente acúmulo de ácido abiético nas algas oferecidas. Nas concentrações mais elevadas de 8.1 e 9 ppm, as dáfrias não conseguiram completar uma semana de vida em todas as triplicatas. Ou seja, neste caso, o efeito tóxico aumentou com o aumento da concentração de ácido abiético nas algas. Tal resultado confirma o pressuposto inicial do trabalho de que poderia ocorrer a bioacumulação do agente tóxico na alga, ou, como os dados da cromatografia evidenciam, um possível intermediário de biotransformação do ácido abiético.

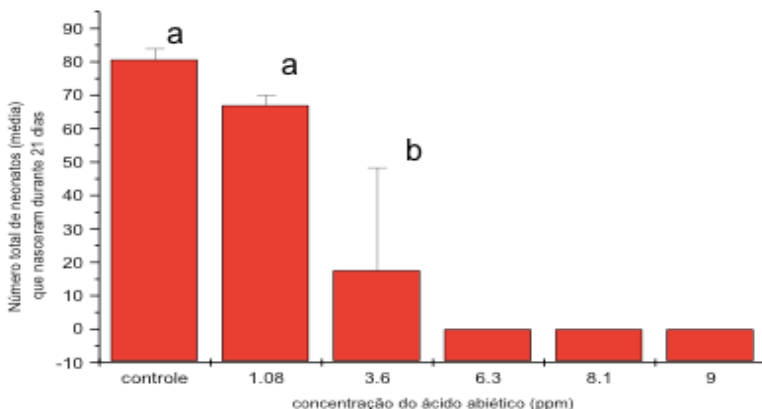
Figura 8: Teste de reprodução de 21 dias- Dáfnias não expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas em diferentes concentrações do ABT. O gráfico mostra o número médio de neonatos em função das concentrações diferentes colocadas nas algas (ppm) que serviram de alimento. As letras indicadas no gráfico significam que os valores são semelhantes ou diferentes do controle (a, b, c), $p \leq 0.05$.



4.2.3 Teste de reprodução 21 dias- Dáfnias expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas nas mesmas concentrações do ácido abiético:

O número médio de neonatos para as dáfnias expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas nas mesmas concentrações do ácido, reduziu-se conforme as concentrações da resina foram aumentadas em ambos (no meio e nas algas) (figura 9). Assim, diferentemente do experimento anterior, onde as dáfnias não eram diretamente expostas, as dáfnias nas concentrações de 6,3 ppm não sobreviveram. E da mesma maneira do experimento acima, as concentrações de 8.1 e 9 ppm foram altas o suficiente para impedir a sobrevivência das mesmas também. Dessa forma, o efeito combinado da exposição direta da dáfnia à resina juntamente a uma alimentação baseada em algas contaminadas, claramente reforçaram os efeitos tóxicos e bioacumulativos já demonstrados anteriormente do ácido abiético (figura 8) para esses microcrustáceos.

Figura 9: Teste de reprodução de 21 dias- Dáfnias expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas nas mesmas concentrações de ácido abiético. O gráfico mostra o número médio de neonatos em relação às diferentes concentrações de ácido abiético (ppm) referentes à exposição e alimentação pelas quais as dáfnias foram submetidas. As letras indicadas no gráfico significam que os valores são semelhantes ou diferentes do controle (a, b, c), $p \leq 0.05$.



4.3 Efeitos sobre aspectos morfológicos das dáfnias

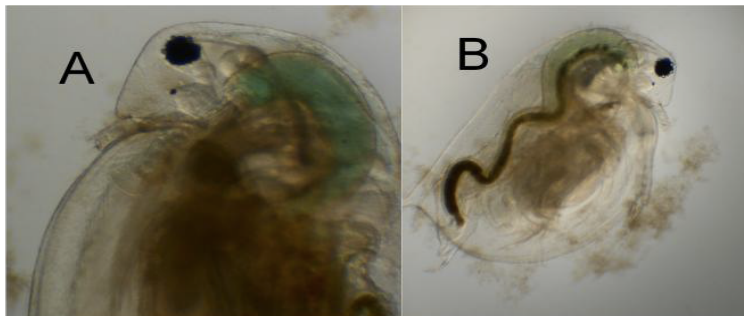
4.3.1 Dáfnias expostas a diferentes concentrações do ácido abiético e alimentadas com alga normal (cultivadas sem contaminação pelo ABT):

Nas dáfnias expostas a diferentes concentrações do ABT mas alimentadas com algas crescidas em meio de cultivo normal, observou-se alterações, como encurtamento e curvatura do espinho apical, coloração pálida e elevada presença de machos (figura 10 e 11), principalmente nas concentrações mais elevadas (4.5 e 6.3 ppm).

Neste bioensaio observou-se uma maior quantidade de machos em relação ao controle, principalmente nas concentrações mais altas (2.34 ; 4.5 e 6.3 ppm). A maior presença de machos no bioensaio pode estar relacionada ao estresse provocado pelo agente tóxico em estudo. Olmstead & Leblanc (2000), demonstraram que a reprodução das dáfnias pode ser alterada com a exposição de xenobióticos. Já que a presença de machos no meio ambiente é uma tentativa de aumentar as chances de sobrevivência em uma situação de estresse, pois há produção de efípios (ovos de resistência) que aumentam as chances de

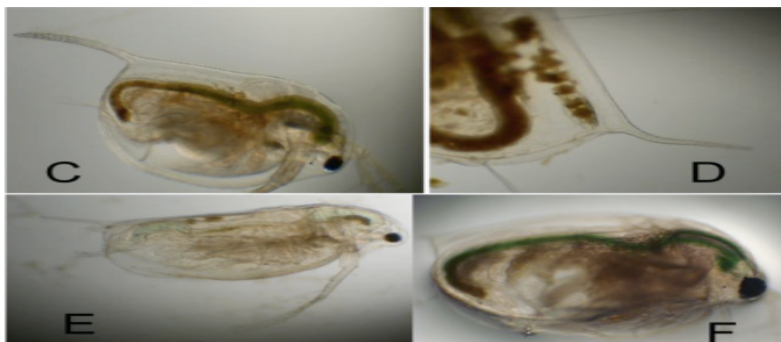
sobrevivência da população e que poderá resultar em uma diversificação genética de novas gerações e assim um maior sucesso na sobrevivência (Pennak, 1953).

Figura 10: Filhotes de dáfias expostas a diferentes concentrações do ABT e alimentadas com algas crescidas em meio de cultivo normal. A e B são dáfias machos.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 11: Filhotes de *Daphnia magna* expostas a diferentes concentrações de ABT e alimentadas com algas crescidas em meio de cultivo normal. Curvatura do espinho apical (C e D), coloração pálida (E) e encurtamento do espinho apical (F).



Fonte: elaborado pela autora.

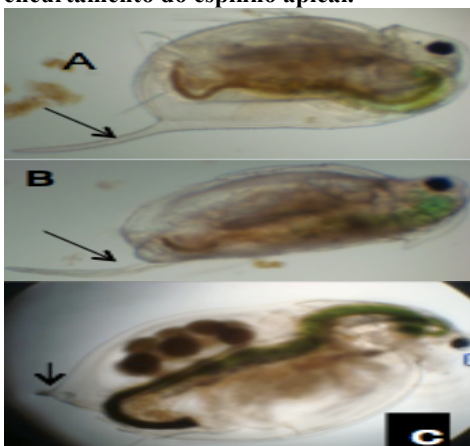
4.3.2 Dáfias não expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas em diferentes concentrações do ABT:

Nas dáfias que não foram expostas ao ABT mas foram alimentadas com algas crescidas em diferentes concentrações do ABT observou-se alterações morfológicas semelhantes às dáfias expostas ao

ABT e alimentadas com as algas também expostas. A longevidade das dáfias na concentração de 3.6 ppm e 6.3 ppm foi maior que nas dáfias expostas ao ABT, durando 21 dias e gerando filhotes. As alterações morfológicas encontradas foram: encurtamento e curvatura do espinho apical, coloração mais fraca nas concentrações mais altas (3.6 ppm e 6.3 ppm) (figura 12).

Figura 12: Filhotes de *Daphnia magna* não –expostos ao ABT mas alimentados com algas crescidas em diferentes concentrações de ABT (A, B), apresentando curvatura no espinho apical.

Em C *Daphnia magna* adulta crescida em meio de cultivo normal e alimentada com alga contaminada com ABT apresentando embriões e encurtamento do espinho apical.



Fonte: elaborado pela autora.

4.3.3 Dáfias expostas ao ácido abiético e alimentadas com algas cultivadas na mesma concentração do ABT:

Nas dáfias expostas a diferentes concentrações de ABT e alimentadas com algas crescidas nas mesmas concentrações foram observadas as seguintes alterações morfológicas: curvatura do espinho apical, tamanho do corpo menor que o do controle (figura 14), alteração no tubo digestivo, coloração diferenciada do controle (mais pálidas e transparentes) (figura 13), sendo estas mais severas, principalmente nas concentrações de 3.6 ppm de ABT. Na concentração de 1.08 ppm observou-se a curvatura do espinho apical e uma coloração mais transparente. Nas demais concentrações testadas as dáfias morreram antes de completarem 10 dias de exposição, não gerando filhotes.

Figura 13: Filhotes de *Daphnia magna* expostos a concentrações de 3.6 ppm de ABT e alimentadas com algas crescidas na mesma concentração. Curvatura do espinho apical (A, B e C) e má formação do tubo digestivo (A e B). *Daphnia magna* macho (D).



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 14: Filhote de *Daphnia magna* controle.



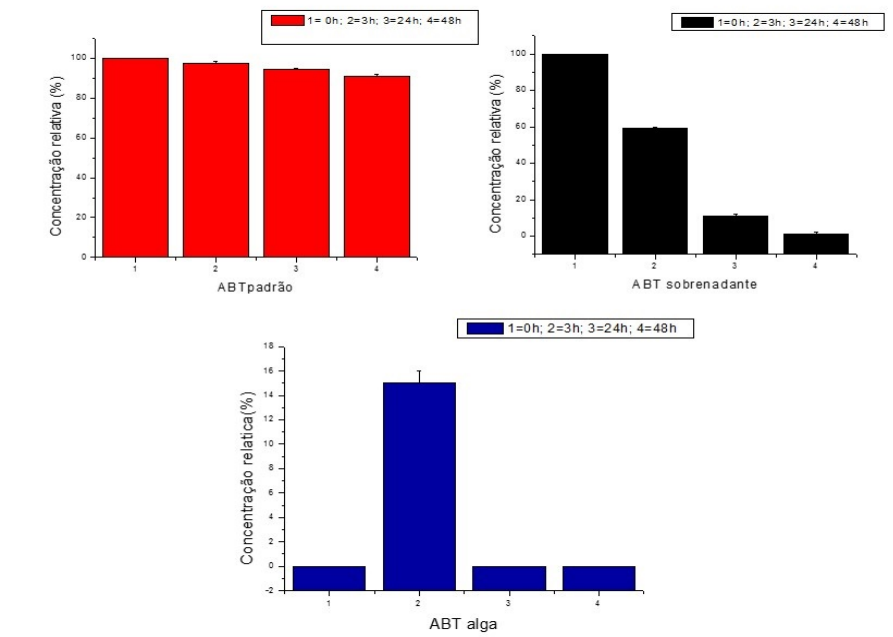
Fonte: elaborado pela autora.

4.4 Cromatografia

Os resultados dos experimentos de reprodução das dáfias evidenciaram que este organismo, quando alimentado com algas expostas ao (ABT), tem sua reprodução alterada. Como mencionado, esse resultado indica que, em tese, a alga pode reter ou bioacumular a referida substância. Os resultados das análises cromatográficas (figura 15) realizadas não demonstraram que o ABT se degrada ao longo das horas no meio de cultivo. Sua concentração pouco reduz ao passar do tempo. Já no sobrenadante, observa-se a redução da presença do ABT chegando a zero em 48h. Não há a presença do mesmo em algas no período de 0, 24 e 48h, apenas no período de 3h, onde o ABT já conseguiu entrar no sistema das algas e já está sendo metabolizado. Diferentemente do tempo zero onde o ABT não tinha conseguido entrar ainda nas células das algas.

Dada a alta toxicidade apresentada pela alga no mesmo período, uma possível explicação é que a alga possui a capacidade de biotransformar o ABT e que a substância formada possui alta toxicidade. Neste sentido, diversos trabalhos com bactérias e fungos têm relatado algumas rotas bioquímicas de biotransformação, inclusive incluindo a participação de Citocromos P450 (Martin *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2004) Por outro lado, alguns estudos relatam que em sedimentos de ambientes contaminados com efluentes de indústrias de papel e celulose contendo resinas ácidas, a biotransformação anaeróbica das mesmas pode gerar uma substância que é o reteno, a qual é muito mais tóxica do que as resinas. Nas análises cromatográficas preliminares realizadas, até o momento, nenhuma substância foi identificada como um possível produto de biotransformação. Uma outra possível explicação para o fato de não encontrar o ABT seria a de que o método de extração para realização da análise cromatográfica não foi capaz de extraí-lo. Essa hipótese, embora não possa ser descartada, não parece ser muito provável.

Figura 15: Concentração do ABT em diferentes intervalos de tempo. Onde ABT padrão= ABT no meio de cultivo sem a alga; ABT sobrenadante= concentração do ABT no meio de cultivo após centrifugação da alga e ABT alga= concentração do ABT na alga após extração com solvente.



Fonte: elaborado pela autora.

CONCLUSÃO

Em relação aos bioensaios com *Daphnia magna* *Scenedesmus subspicatus* ficou evidente que cada espécie apresentou sensibilidade e tolerância específica as diferentes concentrações do ABT, o que mostra a importância da utilização de organismos de níveis tróficos diferentes nos testes de toxicidade, uma vez que a toxicidade pode não ser claramente observada para um determinado organismo, mas bastante evidente para outros. Além disso, os bioindicadores escolhidos se mostraram adequados na caracterização da toxicidade do agente tóxico em estudo.

O ácido abiético se mostrou tóxico aos microrganismos estudados e evidenciou um comportamento bioacumulativo nas algas alterando a morfologia bem como a reprodução das dáfrias. Quanto maior a concentração do ABT menor o tempo de vida das dáfrias, principalmente quando alimentada com as algas também expostas ao ABT. Possivelmente a má formação do tubo digestivo leva a uma menor absorção de alimento e nutrientes do meio, o que leva a morte prematura de algumas delas.

No entanto, a análise cromatográfica mostrou um desaparecimento do ácido abiético ao longo das horas, o que nos permite concluir que essa resina possivelmente se biotransforma em uma substância potencialmente tóxica aos microrganismos.

Sendo assim, este trabalho confirma os riscos ambientais que se encontram nos efluentes das indústrias de papel e celulose, e reforça os argumentos em prol de legislações mais severas ao despejo e tratamento dos mesmos.

6. REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com *daphnia spp* (Cladocera, Crustácea)**. Rio de Janeiro: p. 17. 2004e.

ARAGÃO, M. A. e ARAÚJO, R.P.A. 2006. **Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. Cap. 6, p: 117 – 152. 2006.** In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E. 2006. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. ZAGATTO e BERTOLETTI (org.) São Carlos: Rima; 2006.

BARREIROS, R. M. **Modificações na qualidade da madeira *Eucalyptus grandis* causadas pela fertilização com lodo de esgoto.** 2006. 112 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BICHO, P. A; MARTIN, V; SADDLER, J.N. **Growth, induction and substrate specificity of dehydroabietic acid- degrading bacteria isolated from a kraft mill effluent enrichment.** Appl. Environ. Microbiol, 61: 3245-3250, 1995.

BORGSMANN, U. **Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic systems : bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches.** Aquatic Ecosystem Health & Management, 3:3, 277-289, 2000.

BRACELPA, 2014. **Associação Brasileira de Celulose e Papel.** Dados do Setor < <http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>>

CANIZARES, E.M.P.N ; ZINI, C.A. **As implicações da convenção de Estocolmo para a indústria de celulose e papel.** O papel, vol. 70(4), 51-63, 2009.

CETESB- **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Treinamento Prático especializado: Testes de toxicidade com organismos aquáticos de águas continentais.** São Paulo, 1988.

CHERUBIN, M. **Introdução ao processo de extração de celulose e fabricação de papel.** São Paulo: ABTCP, 21 p. 1999.

CONNELL, D. W.; MILLER, G. J.; ***Chemistry and Ecotoxicology of Pollution***, John Wiley & Sons: New York, 1984.

DE PAIVA, M. B. **Avaliação de risco ambiental utilizando parâmetros físico- químicos e biológicos no rio Canoas/ SC.** 2004. 19f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental, Área de Concentração em Tecnologias de Saneamento) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

DJOMO, J.E; FERRIER, V; GAUTIER, L; ZOLL-MOREUX, C; MARTY, J. **Amphibianmicron ucleus test invivo: evaluation of the genotoxicity of some polycyclic aromatic hydrocarbons found in a crude oil.** Mutagenesis, 10 (3):223-6, 1995.

FENGEL, D.; WEGENER, O. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FISHER, N.S.; HOOK, S.E. **Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals.** Toxicology, v. 181-182, p. 531-536, 2002.

HAMILTON, M.A; RUSSO, RC; THURTON, RV. **Trimmed Spearman-Kärber method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays.** Environ Sci Technol, New York, v. 11, n. 7, p. 714-9. 1977.

HEBERT, P, D, N. **The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae).** Biol Rev, 53: 387-426, 1978.

HOOK, S.E; FISHER, N.S. **Relating the reproductive toxicity of five ingested metals in calanoid copepods with sulfur affinity.** Marine Environmental Research, v. 53, p. 161- 174, 2002.

HULSMANN, S. **Reproductive potential of *Daphnia galeata* in relation to food conditions: implications for a changing size- structure of the populations.** Hydrobiology, v. 491, p.35, p. 79-90, 2001.

ISO - International Organization for Standardization. ISO 6341:2012. Water Quality – **Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)** – Acute toxicity test

KAMAYA, Y ; TOKITA, N ; SUZUKI, K. **Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival reproduction of the crustacean *Daphnia magna*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 61, 83-88, 2005.

KORPELAINEN, H. **Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals.** Biol Rev 65:147-184, 1990.

LISS, N. S ; BICHO, P. A ; SADDLER, J.N. **Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents : a minireview.** Can. J. Microbiol. Vol. 43, 1997.

MAKRIS, S, P; BANERJEE, S. **Fate of resin acids in pulp mill secondary treatment systems.** Water Research, 36: 2878-282, 2002.

MARTIN-CREZBURG, D; VON ELERT, E. **Good food versus bad food : the role of sterols and polyunsaturated fatty acids in determining growth and reproduction of *Daphnia magna*.** Aquatic Ecology. DOI 10.1007/s1052-009-9239-6, 2009.

MARTIN, V.J.J ; YU,Z ;MOHN,W.W. **Recent advances in understanding resin acid biodegradation : microbial diversity and metabolism.** Archives of Microbiology, 172 : 131-138, 1999.

MATTIG, F.R ; BALLIN, U ; BIETZ, H ; GIESSING, K ; KRUSE, R;BECKER, P.H. **Organochlores and heavy metals in benthic invertebrates and fish from the back barrier of Spiekeroog.** Arch. Fish. Mar. Res, 45 :113-133, 1997.

MCMARTIN, D.W ; GILLIES, J.A ; TUMPLING VON, W ; HEADLEY, J.V. **Observations of resin acid distribution in the River Saale, Germany.** Canadian Water Resources Journal.Vol. 28, No 3, 2003.

MILESTONE, C. B ; ORREGO, R ; SCOTT, P.D ; WAYE, A ; KOHLI, J ; O'CONNOR, B.I ; SMITH, B ; ENGELHARDT, H ; SERVOS, M. R ; MACLATCHY, D ; SMITH, D. S ; TRUDEAU, V. L ; ARNASON, J. T ; KOVACS, T ; FURLEY, T. H ; SLADE, S.H ; HOLDWAY, D. A ; HEWITT, L.M. **Evaluating the Potencial of Effluents and Wood Feedstocks from Pulp and Paper Mills in Brazil, Canada, and New Zealand to Affect Fish Reproduction : Chemical Profiling and In Vitro Assessments.** Environmental Science Technology. Vol. 46, 1849-1858, 2012.

MOHN, W.W; STEWART, G.R. **Bacterial metabolism of chlorinated dehydroabietic acids occurring in pulp and paper mill effluents.** Appl.Environ. Microbiol. Vol. 63, No.8, 1997.

NETO, G. C. **Decomposição de fenol e efluente da indústria de papel e celulose por fotocatalise heterogênia.** Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

OECD (2004) - Organisation for Economic Co-operation and Development, *Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

OECD (2012) - Organisation for Economic Co-operation and Development, *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.

OIKARI, A ; HOLMBO, B ; BISTER, H. **Uptake of resin acids into tissues of trout (*Salmo gairdneri* Richardson).** Ann Zool. Fennici 19 : 61-64, 1982.

OLMSTEAD, A.W; LEBLANC, G.A. **Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*.** Environ. Toxicol. Chem. 19 (8), 2107-2113, 2000.

ORCHARD, S.J. et al. **A rapid response toxicity test based on the feeding rate of the tropical cladoceran *Moinodaphnia macleayi*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 53, p.12-19, 2002.

PANDELIS, Z ; GUCHARD ; HOLDWAY, D. **Dehydroabietic acid (DHAA) alters metabolic enzyme activity and the effect of 17 β -estradiol in rainbow**

trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 101, 168-176, 2014.

PANSHIN, A. J.; ZEEUW, C. de. **Textbook of wood technology**. 3ed. New York: Mc Graw-Hill, 705p. 1970.

PENG, G ; ROBERTS, J. **Solubility and Toxicity of resin acids**. Wat. Res, Vol. 34, No. 10, pp 2779-2785, 2000.

PENNAK, R. Fresch- **Water Invertebrates of the United States**. New York, The Ronald Press, 1953.

PERALES- VELA, H.V; GONZÁLEZ-MORENO, S; MONTES-HORCASITAS, C; CAÑIZARES- VILLANUEVA, R.O. **Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassalutus* (Chlorophyceae)**. Chemosphere 67, 2274-2281, 2006.

RATTE, T.H. **Bioaccumulation and Toxicity of silver compounds : A Review**. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 18, No. 1, pp. 89–108, 1999.

SMITH, D.J ; MARTIN, V.J ; MOHN, W.W. **A cytochrome P450 involved in the metabolism of abietane diterpenoids by *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9**, 186 (11) : 3631-3639, 200, SOARES, C.H. L ; BAPTISTA, I. E ; Van der Kraak, G **Reproduction Impairment In Zebrafish Exposed To Abietic Acid**, submetido 2015.

SREEKRISHNAN, M. A. M. **Aquatic Toxicity from Pulp and Paper Mill Effluents: a review.** Advances in Environmental Research. v. 5, p. 175-196, 2001.

TAYLOR, G; BAIRD, D.J; SOARES, A.M.V. **Surface binding contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna*** Straus. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 17, p. 412-419, 1998.

TERASAKI, M; SHIRAISHI, F; FUKAZAWA, H; MAKINO, M. **Potency of Resin Acids in Paper Mill Effluents.** Environ. Sci. Technol. 43, 9300-9305, 2009.

TRAINOR, F.R. **Reproduction in *Scenedesmus*.** Algae (The Korean Journal of Phycology). Vol. 11(2): 183-201, 1996.

WANG, W.X; KE, C. **Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods.** Aquatic Toxicology, v. 52, p. 153-156, 2002.

WANG, Z ; CHEN, T ; GAO, Y ; BREUIL, C ; HIRATSUKA, Y. **Biological Degradation of Resin Acids in Wood Chips by Wood- Inhabiting Fungi.** Environmental Microbiology. Vol. 61, 1995.

XAVIER, C ; CHAMORRO, S ; VIDAL, G. **Chronic effects of Kraft mill effluents and endocrine active chemicals on *Daphnia magna*.** Environmental Contamination and Toxicology, 75 : 670-676, 2005

7. ANEXOS

Anexo 1 – meios de cultivo de *Scenedesmus subspicatus* e de *Daphnia magna*

A- Meio de Cultivo de *Scenedesmus subspicatus*

Preparação do Meio de Cultivo da OCDE com base em orientações de ensaios da OCDE 201

Para a preparação de 1L de meio de cultivo:

- Adicionar em 500 ml de água deionizada:
 - 10 ml da solução-estoque 1
 - 1 ml das soluções-estoque 2, 3 e 4.
- Completar até 1L com água deionizada.

OBS.: as soluções-estoque devem ser autoclavadas (120°C, 15 min) e guardadas em frascos escuros, a 4°C.

Nutrientes	Concentração da solução em estoque
Solução-estoque 1: macronutrientes	
NH ₄ Cl	1,5 g/L
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1,2 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,8 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,16 g/L
Solução-estoque 2: ferro	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	64 mg/L
EDTA-Na ₂ · 2H ₂ O	100 mg/L
Solução-estoque 3: elementos-traço	
H ₃ BO ₃	185 mg/L
MnCl ₂ · 4H ₂ O	415 mg/L

ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,5 mg/L
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7 mg/L
Solução-estoque 4: bicarbonato	
NaHCO ₃	50 g/L
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	50 g/L

B- SOLUÇÕES TESTES DO CULTIVO DE *Daphnia magna*

Água de Diluição (Meio Básico) utilizadas nos testes de sensibilidade com *Daphnia magna*

Meio Básico

Solução-estoque	composição	Composição	Quantidade p/ 20L
A	Ca Cl ₂	73,52 g Ca Cl ₂ ·2H ₂ O	80 mL
B	MgSO ₄	123,3 g MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 mL
C	KCl	5,8 g KCl	20 mL
D	NaHCO ₃	64,8 g NaHCO ₃	20 mL

Obs: Todas as substâncias foram dissolvidas em 1 litro de água destilada

Meio de cultivo

(O meio de cultivo deve ser preparado com o Meio básico e o Meio M4)

Meio M4 (M4 - Medium)

Solução-estoque	Composição	Quantidade p/ 20L
Solução Catiônica	3065 mg MnCl ₂ ·4H ₂ O 3060 mg LiCl 710 mg RbCl 1520 mg SrCl ₂ ·6H ₂ O 167,5 mg CuCl ₂ ·2H ₂ O 130 mg ZnCl ₂	2 mL

	100 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	
Solução Aniônica	548 mg NaNO_3 5719 mg H_3BO_3 32 mg NaBr 126 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6,5 mg KI 4,38 mg Na_2SeO_3 1,15 mg NH_4VO_3	10 mL
Solução de Silicato*	21,465 mg Na_2SiO_3	- 4 mL
Solução de Fe/EDTA	500 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 199,1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mL
Solução de Fosfato	286 mg KH_2PO_4 386 mg K_2HPO_4	10 mL
Solução Vitamínica	750 mg Hidrocloreto de Tiamina 10 mg Cianocabalina 7,5 mg Biotina	2 mL

Após misturar as soluções do Meio básico mais as do Meio M4, completa-se para 20 litros com água deionizada, deixando aerar durante 24 horas antes da utilização.

Obs.: - As soluções de Fe/EDTA foram preparadas separadamente (cada uma com 500 mL de água bidestilada), depois de misturadas levou-se para autoclave a $121^\circ\text{C}/15$ minutos. A solução vitamínica foi completada com 1 litro de água bidestilada, sendo

estocada em pequenas quantidades, em recipientes fechados (tubos de ensaio lacrados com filme plástico), no freezer. O pH deve ser corrigido com soluções de NaOH e HCl 1N.

ANEXO 2

DATE: abril de 2014 TEST NUMBER: 1 DURATION:
24 H
TOXICANT : ABT
SPECIES: Daphnia magna

RAW DATA: Concentration	Number	Mortalities
--- ---- (ppm)	Exposed	
.00	20	0
1.12	20	0
2.25	20	0
4.50	20	0
6.30	20	0
7.20	20	0
8.10	20	0
9.00	20	0
9.90	20	6
10.80	20	16
18.00	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:
EC50: 10.68
95% LOWER CONFIDENCE: 10.09
95% UPPER CONFIDENCE: 11.30

DATE: abril de 2014 TEST NUMBER: 1 DURATION:
48 H
TOXICANT : ABT
SPECIES: Daphnia magna

RAW DATA: Concentration	Number	Mortalities
--- ---- (ppm)	Exposed	

.00	20	0
1.12	20	0
2.25	20	0
4.50	20	0
6.30	20	0
7.20	20	0
8.10	20	0
9.00	20	1
9.9	20	9
10.80	20	20
18.0	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:

EC50: 9,87

95% LOWER CONFIDENCE: 53.64

95% UPPER CONFIDENCE: 56.11

24H – EC50: 10,68 ppm (

48H – EC50: 9,87 ppm (54.86 ml da solução de ABT – 360 mg/20 ml de etanol)

DATE: outubro de 2015

TEST NUMBER: 1

DURATION:

24 H

TOXICANT : ABT

SPECIES: *Daphnia magna*

RAW DATA: Concentration	Number	Mortalities
--- ---- (ppm)	Exposed	
.00	10	0
1.12	10	0
2.25	10	0
4.50	10	0
6.30	10	0
7.20	10	0
8.10	10	0
9.00	10	0
9.90	10	3
10.80	10	9
18.00	10	10

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:

EC50: 10.37
95% LOWER CONFIDENCE: 9.74
95% UPPER CONFIDENCE: 11.04

TEST NUMBER: 2 DURATION: 24 H
TOXICANT : ABT
SPECIES: Daphnia magna

RAW DATA: Concentration	Number	Mortalities
--- ---- (ppm)	Exposed	
.00	10	0
1.12	10	0
2.25	10	0
4.50	10	0
6.30	10	0
7.20	10	0
8.10	10	0
9.00	10	0
9.90	10	2
10.80	10	8
18.00	10	10

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:

EC50: 10.78
95% LOWER CONFIDENCE: 9.96
95% UPPER CONFIDENCE: 11.67

TEST NUMBER: 1 DURATION: 48 H
TOXICANT : ABT
SPECIES: Daphnia magna

RAW DATA: Concentration	Number	Mortalities
--- ---- (ppm)	Exposed	

.00	10	0
1.12	10	0
2.25	10	0
4.50	10	0
6.30	10	0
7.20	10	0
8.10	10	0
9.00	10	0
9.90	10	5
10.80	10	10
18.00	10	10

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:

EC50: 9.88
95% LOWER CONFIDENCE: 9.60
95% UPPER CONFIDENCE: 10.17

TEST NUMBER: 2 DURATION: 48 H
TOXICANT : ABT
SPECIES: Daphnia magna

RAW DATA: Concentration	Number	Mortalities
--- ---- (ppm)	Exposed	
.00	10	0
1.12	10	0
2.25	10	0
4.50	10	0
6.30	10	0
7.20	10	0
8.10	10	0
9.00	10	0
9.90	10	4
10.80	10	10
18.00	10	10

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:

EC50: 9.97
 95% LOWER CONFIDENCE: 9.69
 95% UPPER CONFIDENCE: 10.26

TEST NUMBER: 1 DURATION: 24 H
 TOXICANT : ABT
 SPECIES: *Daphnia magna*

RAW DATA: Concentration --- ---- (ppm)	Number Exposed	Mortalities
.00	10	0
1.12	10	0
2.25	10	0
4.50	10	0
6.30	10	0
7.20	10	0
8.10	10	0
9.00	10	0
9.90	10	3
10.80	10	8
18.00	10	10

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:

EC50: 10.68
 95% LOWER CONFIDENCE: 9.86
 95% UPPER CONFIDENCE: 11.57

TEST NUMBER: 2 DURATION: 24 H
 TOXICANT : ABT
 SPECIES: *Daphnia magna*

RAW DATA: Concentration --- ---- (ppm)	Number Exposed	Mortalities
.00	10	0
1.12	10	0
2.25	10	0

4.50	10	0
6.30	10	0
7.20	10	0
8.10	10	0
9.00	10	0
9.90	10	3
10.80	10	8
18.00	10	10

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:

EC50: 10.68

95% LOWER CONFIDENCE: 9.86

95% UPPER CONFIDENCE: 11.57

TEST NUMBER: 1 DURATION: 48 H

TOXICANT : ABT

SPECIES: Daphnia magna

RAW DATA: Concentration	Number	Mortalities
--- ---- (ppm)	Exposed	
.00	10	0
1.12	10	0
2.25	10	0
4.50	10	0
6.30	10	0
7.20	10	0
8.10	10	0
9.00	10	1
9.90	10	5
10.80	10	10
18.00	10	10

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:

EC50: 9.78

95% LOWER CONFIDENCE: 9.45

95% UPPER CONFIDENCE: 10.12

TEST NUMBER: 2 DURATION: 48 H
 TOXICANT : ABT
 SPECIES: Daphnia magna

RAW DATA: Concentration	Number	Mortalities
--- ---- (ppm)	Exposed	
.00	10	0
1.12	10	0
2.25	10	0
4.50	10	0
6.30	10	0
7.20	10	0
8.10	10	0
9.00	10	0
9.90	10	5
10.80	10	10
18.00	10	10

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:
 EC50: 9.88
 95% LOWER CONFIDENCE: 9.60
 95% UPPER CONFIDENCE: 10.17

Teste de toxicidade aguda - outubro de 2015
 (*Daphnia magna* em ABT)

	Teste 1 (ppm)				Teste 2 (ppm)			
	24H		48H		24H		48H	
	1	2	1	2	1	2	1	2
EC50	10,68	10,68	9,78	9,88	10,37	10,78	9,88	9,97
95% LC	9.86	9,86	9,45	9,60	9,74	9,96	9,60	9,69
95% UC	11,57	11,57	10,12	10,17	11,04	11,67	10,17	10,26

LC: LOWER CONFIDENCE

UC: UPPER CONFIDENCE

Média:

24H – EC50: 10,62 ppm

48H – EC50: 9,88 ppm (54,88 ml da solução de ABT – 360 mg/20 ml de etanol)

Média dos teste de toxicidade aguda de *Daphnia magna* em ABT (48H)
(abril de 2014 e outubro de 2015)

EC50: 9,87 ppm (54.86 ml da solução de ABT – 360 mg/20 ml de etanol)

95% LOWER CONFIDENCE: 9,61 ppm (53,39 ml da solução de ABT – 360 mg/20 ml de etanol)

95% UPPER CONFIDENCE: 10,13 ppm (56,28 ml da solução de ABT

